

N° d'enregistrement
au C.N.R.S. A.O. 9817

Articles principaux
recouvrant en partie

la T H E S E présentée
pour l'obtention

du grade de DOCTEUR ES SCIENCES
Mention : Sciences Naturelles

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par Monsieur Jean Paul TRUCHOT

Sujet de la Thèse :

*"Le transport des gaz respiratoires (oxygène et
dioxyde de carbone) par le sang du crabe
Carcinus maenas (L.)"*

Soutenue le : 17 mai 1974

Devant la Commission d'Examen composée de :

MM.	P. DRACH	Président
	G. ECHALIER	Examineurs
	P. DEJOURS	
	J. BERGERARD	Membre Invité

FIXATION ET TRANSPORT DE
L'OXYGÈNE PAR LE SANG DE
CARCINUS MAENAS: VARIATIONS EN
RAPPORT AVEC DIVERSES CONDITIONS
DE TEMPÉRATURE ET DE SALINITÉ

J. P. TRUCHOT

Reprinted from
NETHERLANDS JOURNAL OF SEA RESEARCH
7 (1973)

E. J. BRILL, LEIDEN



FIXATION ET TRANSPORT DE L'OXYGÈNE PAR LE SANG DE CARCINUS MAENAS: VARIATIONS EN RAPPORT AVEC DIVERSES CONDITIONS DE TEMPÉRATURE ET DE SALINITÉ

par

J. P. TRUCHOT

(Laboratoire de Zoologie, Université de Paris, France)
 (Laboratoire de Physiologie Respiratoire CNRS, Strasbourg, France)

TABLE DES MATIÈRES

I. Introduction	482
II. Matériel et méthodes	483
III. Résultats	485
1. Variations <i>in vitro</i> de P_{50} avec la température	485
2. Variations de P_{50} dans le sang de crabes adaptés à diverses températures	486
3. Variations de pH et PCO_2 dans le sang prébranchial en rapport avec la salinité de l'eau dans laquelle vit l'animal	488
4. Variations de P_{50} dans le sang en rapport avec la salinité de l'eau dans laquelle vit l'animal.	490
IV. Discussion	491
V. Résumé—English summary	493
VI. Références	494

I. INTRODUCTION

Les propriétés physicochimiques de l'hémocyanine en ce qui concerne la fixation de l'oxygène ainsi que son rôle dans le transport des gaz par le sang des crustacés décapodes ont fait l'objet de nombreuses recherches depuis plus d'un demi-siècle (WOLVEKAMP & WATERMAN, 1960). L'hémocyanine est un pigment respiratoire contenant du cuivre dont l'affinité pour l'oxygène, mesurée par la pression partielle d'oxygène à demi-saturation P_{50} , est susceptible de varier avec de nombreux facteurs: pH , température, concentration de divers ions dans la solution où elle est placée (WOLVEKAMP, 1961; SPOEK, 1967). Son intervention effective dans le transport de l'oxygène par le sang a été longtemps discutée (*cf.* REDMOND, 1955; ZUCKERKANDL, 1957), puis reconnue par toutes les études modernes (REDMOND, 1955, 1962, 1968; SPOEK, 1962; JOHANSEN, LENFANT & MECKLENBURG, 1970). Sur divers crustacés décapodes, il a été montré que les conditions de PO_2 et pH dans les sangs

prébranchial et postbranchial étaient telles que 80 à 95% de l'oxygène transporté aux tissus l'était sous forme d'oxyhémocyanine.

L'une des caractéristiques de l'hémocyanine est son faible pouvoir de combinaison avec l'oxygène qui est, à poids de protéine égal, environ 5 fois moindre que celui de l'hémoglobine. Les sangs de crustacés décapodes ne contiennent jamais plus de 2 mM.l⁻¹ d'oxygène combiné lorsque la saturation complète du pigment est atteinte; cette valeur peut tomber à des taux très bas dans certains cas; chez *Carcinus maenas*, nous avons relevé des valeurs comprises entre 0.2 et 0.6 mM.l⁻¹ (TRUCHOT, 1971a). Dans les conditions où la demande métabolique d'oxygène est importante, il est donc possible que le système de transport soit à la limite de ses capacités. On conçoit que, dans ce cas, des conditions optimum doivent être réalisées pour son fonctionnement de façon à lui conférer une efficacité maximum. L'analyse de telles conditions est évidemment fort complexe, car elle doit inclure tous les aspects des mécanismes respiratoires: ventilation, perfusion par le sang des organes d'échanges (branchies) et des tissus, propriétés physicochimiques du sang et de l'hémocyanine. La présente étude est limitée à ce dernier aspect du problème. Les conditions dans lesquelles l'oxygène est fixé par le sang, puis libéré au niveau des tissus, dépendent des caractéristiques de la courbe de dissociation du pigment respiratoire parmi lesquelles la plus explicite est l'affinité pour l'oxygène définie habituellement par P_{50} . Toute variation du système de transport se manifestera donc vraisemblablement par un changement de ce paramètre ainsi que des facteurs, pH en particulier, dont il dépend.

L'animal choisi pour cette étude, le crabe littoral *Carcinus maenas* (L.), est une espèce particulièrement eurytherme et euryhaline. On peut estimer que, dans la zone intertidale, il peut être exposé à des températures extrêmes variant de 0 à 30° C; il existe également en populations encore nombreuses dans des eaux de salinité inférieure à 10‰ S (DAHL, 1956). Ses besoins en oxygène varient avec la température ambiante (WALLACE, 1972) et avec la salinité de l'eau dans laquelle il vit (SCHWABE, 1933). Nous avons recherché quelles sont, dans ces circonstances, les variations qui affectent le système de transport de l'oxygène.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux et conditions d'élevage.—Les crabes utilisés pour cette étude sont des mâles adultes au stade C₄ de l'intermue (DRACH, 1939). Capturés à Roscoff, Nord-Finistère, France où ils vivent en eau de mer de salinité normale, ils sont stockés avant utilisation à Paris dans un aquarium fonctionnant en circuit fermé (température 12 à 15° C; sali-

nité 35 à 36 ‰ S). Les effets des variations de température et de salinité sur le système de transport de l'oxygène ont été étudiés sur des crabes préalablement acclimatés aux conditions envisagées. Cette acclimatation dure de 4 à 6 jours et est réalisée dans des bacs contenant environ 20 l d'eau de mer naturelle (ou diluée avec de l'eau distillée) convenablement aérée. Le niveau est maintenu assez haut dans les bacs pour que les crabes restent immergés en permanence; l'eau est renouvelée toutes les 48h. Les écarts de température enregistrés sont de l'ordre de $\pm 0.5^{\circ}$ C. En fin de période d'adaptation, la salinité (exprimée en g/kg eau de mer) est estimée à partir d'un dosage de sodium, en utilisant, d'une part un rapport Na: Cl = 0.5549 (WEBB, 1939), d'autre part les tables de Knudsen.

Prélèvement du sang et obtention du sérum.—Pour les mesures de pH et PCO_2 *in vivo*, les prélèvements ont été réalisés suivant un protocole décrit et discuté par ailleurs (TRUCHOT, 1973). Pour les manipulations *in vitro*, le sang a été obtenu par ponction à la seringue dans les sinus infrabranchiaux. Après agglutination spontanée des hémocytes, le sérum est obtenu par simple filtration sur un tampon de gaze hydrophile et conservé tel quel au frigidaire. Le volume des hémocytes ne dépassant pas 1% du volume du sang entier (EVANS, 1972), il a été admis que cette opération conservait les propriétés du sang entier.

Techniques de mesures.—Les mesures de pH ont été pratiquées avec une microélectrode capillaire Radiometer étalonnée avec des tampons phosphate (Radiometer) et équilibrée à la température à laquelle étaient faites les expériences. Sur le sang entier ou le sérum de crabe, la précision obtenue est de l'ordre de 0.01 pH. Les mesures de PO_2 ont été réalisées à l'aide d'une électrode à oxygène type Clarke (Radiometer) étalonnée avec des échantillons de sérum de *Carcinus* de PO_2 connu; ces mesures sont reproductibles à 0.2 à 0.3 torr près. PCO_2 a été estimé par la méthode d'Astrup selon un protocole précédemment décrit (TRUCHOT, 1973). La précision estimée de cette méthode est de ± 0.1 torr. Les calculs des concentrations de bicarbonate et carbonate ont été conduits à l'aide de valeurs de αCO_2 , K'_1 et K'_2 obtenues sur le sérum de *Carcinus* par diverses méthodes non encore publiées.

Courbes de dissociation, affinité du pigment pour l'oxygène et effet Bohr.—Les courbes de dissociation de l'oxyhémocyanine ont été obtenues sur le sérum entier par une méthode précédemment décrite (TRUCHOT, 1971a). Chacune d'elles permet de déterminer une valeur de P_{50} correspondant à une valeur mesurée de pH. Pour étudier les variations de P_{50} avec pH (effet Bohr), 2 procédés différents ont été

utilisés. Dans quelques cas, plusieurs courbes de dissociation ont été établies à des pH différents obtenus par équilibration du sérum à diverses PCO_2 . La plupart du temps, une méthode nouvelle et plus rapide a été employée. Le sérum étant amené à PO_2 voisin de P_{50} et à un % de saturation connu, on y ajoute, à l'abri de l'air, un très faible volume d'une solution alcaline ($NaOH$ 0.1 N) préalablement désoxygénée. Il en résulte une variation de pH qui provoque une nouvelle répartition de l'oxygène entre fraction dissoute et fraction combinée au pigment et par conséquent, une variation de PO_2 et un très faible déplacement du % de saturation. PO_2 et pH sont mesurés dans le sérum ainsi alcalinisé. Connaissant la concentration initiale en O_2 total, le coefficient de solubilité α_{O_2} et le facteur de dilution introduit ($< 1\%$), on peut calculer le nouveau % de saturation. Supposant connue la pente n de la droite de Hill et admettant son invariance avec pH (TRUCHOT, 1971a), on peut obtenir une valeur de P_{50} correspondant au pH mesuré. Cette méthode donne des résultats tout à fait comparables à la précédente, les écarts sur P_{50} ne dépassant pas 0.5 torr, c'est à dire l'ordre de grandeur des erreurs expérimentales estimées.

Dosages.—Les protéines totales du sérum ont été dosées par une méthode au biuret (LEVIN & BRAUER, 1951), en référence à un étalon de sérum-albumine bovine. Les dosages de sodium et potassium ont été réalisés par photométrie de flamme et ceux de calcium et magnésium par complexométrie. Les indicateurs utilisés sont la calcéine (selon DREUX, 1958) pour Ca, et le Noir Eriochrome T (selon BADINAND & WINICKI, 1957) pour Ca + Mg. Les résultats sont exprimés en mEq/kg eau en admettant un volume spécifique partiel des protéines sanguines de 0.73.

III. RÉSULTATS

I. VARIATIONS IN VITRO DE P_{50} AVEC LA TEMPÉRATURE

Sur un même stock de sérum provenant du mélange des sangs de 15 crabes maintenus préalablement plusieurs jours en eau de mer normale à 12-15° C, les variations de P_{50} avec pH ont été établies à 10, 15, 20 et 30° C (Fig. 1). Dans tout l'intervalle de pH étudié (7.1 à 7.9), P_{50} considéré à pH constant, augmente avec la température. Ceci montre que la combinaison du pigment avec l'oxygène est une réaction exothermique, comme c'est le cas pour tous les pigments respiratoires connus (WOLVEKAMP, 1961). L'augmentation de P_{50} avec la température dépend de pH : faible à pH élevé (> 7.6), elle est beaucoup plus importante dans la zone inférieure de pH (< 7.4). En effet, l'effet Bohr, ex-

primé par le rapport $\Delta \log P_{50} / \Delta pH$, varie non seulement avec pH , mais également avec la température. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par REDMOND (1955) chez *Panulirus interruptus*. A même pH , l'effet Bohr est d'autant plus important que la température est plus élevée. Il est intéressant de noter que c'est dans la zone des pH physiologiques (7.5 à 7.9, TRUCHOT, 1973) que les variations de P_{50} avec la température sont les plus faibles.

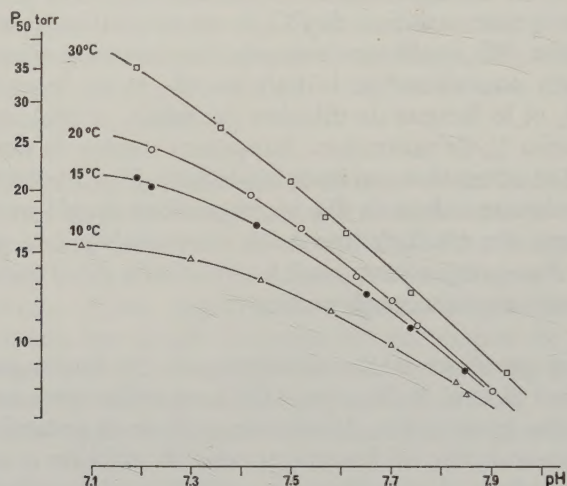


Fig.1. Variations de P_{50} avec pH pour différentes températures dans le sérum entier de *Carcinus maenas*. Tous les points sont obtenus sur le même sérum.

2. VARIATIONS DE P_{50} DANS LE SANG DE CRABES ADAPTÉS A DIVERSES TEMPÉRATURES

Les résultats exposés au paragraphe précédent relèvent d'un seul effet thermodynamique. De plus, mesuré dans les mêmes conditions de température et de pH , P_{50} diffère selon la température à laquelle sont adaptés les animaux. Nos résultats portent sur 9 séries expérimentales de 6 à 10 crabes adaptés à des températures différentes pour des durées variant de 4 à 6 jours. A la même température de 15° C, P_{50} est mesuré en fonction de pH sur des mélanges composés des sérums entiers des crabes de chacune des séries. Les résultats sont présentés sur un diagramme $\log P_{50}$ versus pH (Fig. 2). Les points correspondant au sérum de crabes adaptés à des températures de 5, 8, 10, 15, 16 et 21° C ne diffèrent pas sensiblement. Ces valeurs sont en bon accord avec celles obtenues précédemment sur *Carcinus maenas* (TRUCHOT, 1971b). Par contre, le sérum des crabes adaptés à 26° C, 26.5° C et surtout 32° C

montre, quel que soit pH , des valeurs de P_{50} significativement plus basses, c'est à dire une affinité pour l'oxygène plus élevée de l'hémocyanine. Il est possible que ce déplacement de P_{50} avec la température de l'eau dans laquelle vivent les crabes mette un certain temps à s'établir. En effet, le temps d'adaptation est de 4 jours pour la série 26.5° C et de 6 jours pour la série 26° C qui montre des P_{50} significativement inférieures. Aucune tendance nette à une variation de l'effet Bohr ($\Delta \log P_{50}/\Delta pH$) n'est détectable pour ces résultats.

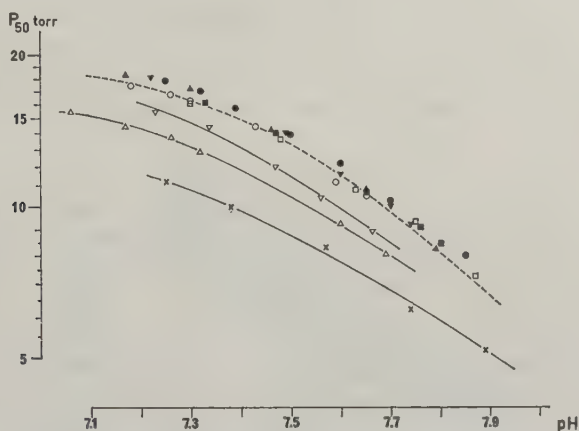


Fig.2. Variations de P_{50} avec pH dans les sérums de crabes adaptés à diverses températures en eau de mer normale. Toutes les mesures sont faites à 15° C. Températures auxquelles les crabes sont adaptés: 5° C (■), 8° C (▲), 10° C (▼), 15° C (●), 16° C (○), 21° C (□), 26° C (△), 26.5° C (▽), 32° C (×). La courbe en pointillé correspond à des valeurs précédemment obtenues (TRUCHOT, 1971b).

TRUCHOT (1973) a montré que pH du sang prébranchial était contrôlé de telle sorte qu'il s'abaisse lorsque la température s'élève. Dans ces conditions donc, deux effets tendent à s'ajouter pour déplacer P_{50} en réduisant l'affinité du pigment pour l'oxygène: le simple effet thermodynamique de variation de P_{50} avec la température (Fig. 1) et le contrôle du pH sanguin à des valeurs plus basses lorsque la température s'élève. Le déplacement *in vivo* de P_{50} ainsi prévisible est important. Nos résultats démontrent cependant, qu'au moins aux températures élevées, il est partiellement compensé par une variation de l'état physicochimique du sang telle que P_{50} (mesuré dans les mêmes conditions de température et de pH) est diminué chez les animaux soumis pour un certain temps à une température supérieure à 21° C. Un ajustement du même ordre a été démontré, d'une part chez le téléostéen *Ictalurus nebulosus* (GRIGG, 1969) et d'autre part chez la grenouille *Rana esculenta*

(KIRBERGER, 1953; STRAUB, 1957). Dans ces deux cas, le sens de la variation constatée est le même, P_{50} étant diminué par l'acclimatation aux hautes températures.

Une évaluation quantitative de l'importance de cet ajustement est possible à l'aide de nos résultats. Pour chaque valeur moyenne de pH relevée *in vivo* à chaque température (TRUCHOT, 1973), on peut chiffrer (Fig. 1) la différence $(\log P_{50})_t - (\log P_{50})_{15}$ correspondant au déplacement thermodynamique de P_{50} , la température de 15° C étant prise comme référence. Cette différence, reportée sur la Fig. 2, donne pour chaque série expérimentale une estimation moyenne, d'une part de P_{50} réel *in vivo* pour chaque température considérée, d'autre part, de P_{50} prévisible si l'ajustement mis en évidence n'existait pas. Les estimations ainsi obtenues (Tableau I) montrent que l'élévation de P_{50}

TABLEAU I

Comparaison des valeurs estimées de P_{50} réel et de P_{50} prévisible en dehors de tout ajustement compensateur. Valeurs moyennes de pH reprises de TRUCHOT (1973).

Température (° C)	pH	$(\log P_{50})_t - (\log P_{50})_{15}$	P_{50} prévisible (torr)	P_{50} réel <i>in vivo</i> (torr)
10	7.80	-0.05	7.5	7.5
15	7.72	0.00	9.3	9.3
20	7.64	0.03	11.5	11.5
26	7.54	0.08	15	12
30	7.48	0.12	18	12

in vivo avec la température est limitée à une valeur plafond d'environ 12 torr.

Le mécanisme de cet ajustement demeure obscur chez *Carcinus maenas*. L'analyse des concentrations de calcium et magnésium, cations connus pour faire varier P_{50} des sangs à hémocyanine (SPOEK, 1967), n'a montré que des variations inconsistantes, ne suffisant pas à expliquer le phénomène. D'autres ions ou substances cependant peuvent intervenir; l'explication des faits mis en évidence demande donc des études supplémentaires.

3. VARIATIONS DE pH ET PCO_2 DANS LE SANG PRÉBRANCHIAL EN RAPPORT AVEC LA SALINITÉ DE L'EAU DANS LAQUELLE VIT L'ANIMAL

Les crabes, au nombre de 8 à 10 par série expérimentale, ont été adaptés à 15° C pendant 6 jours, à des eaux de mer diluées de salinité variant

de 12 à 36‰ S. Les valeurs moyennes de pH et PCO_2 sont reportées en fonction de la salinité (Fig. 3). Nous avons précédemment montré (TRUCHOT, 1973) que le pH du sang prébranchial varie avec la température de telle sorte que le rapport $[OH^-] : [H^+]$ des concentrations

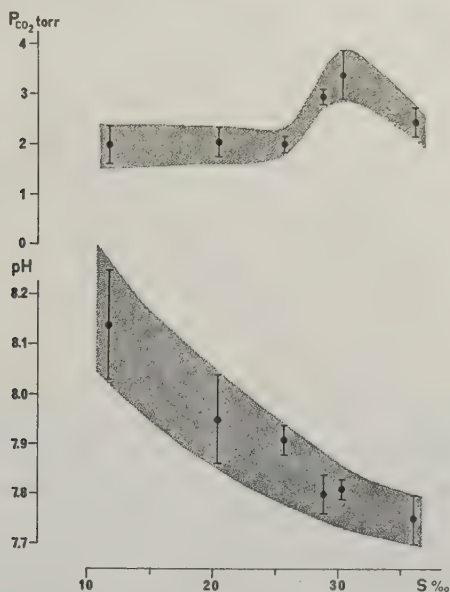


Fig.3. Variations de pH et PCO_2 dans le sang prébranchial de *Carcinus maenas* adaptés⁵ à des eaux de mer de diverses salinités (S‰). Valeurs moyennes $\pm$ t.s.m ($P = 0.05$). Température 15° C.

respectives des ions OH^- et H^+ reste constant et voisin de 12.5 (alcalinité relative constante, HOWELL BAUMGARDNER, BONDI & RAHN, 1970). Ce résultat n'est valable qu'autant que le crabe vit en eau de mer normale (salinité 33 à 36‰ S). En effet, à 15° C, au fur et à mesure que la salinité diminue, le pH moyen du sang prébranchial augmente, passant de 7.75 pour $S = 36‰$ à 8.14 pour $S = 12‰$. Ces valeurs correspondent à un changement du rapport $[OH^-] : [H^+]$ de 14 à 88. La variabilité individuelle augmente avec l'abaissement de salinité; pour une salinité de 12‰ S, les valeurs extrêmes de pH 7.97 et 8.38 ont été rencontrées.

Les variations de PCO_2 accompagnant ces changements de pH sont relativement faibles (Fig. 3, Tableau II). En dehors d'une augmentation transitoire à salinité voisine de 30‰ S, PCO_2 reste sensiblement égal à 2 à 2.5 torr. Les concentrations calculées de bicarbonate et carbonate $[HCO_3^-] + [CO_3^{2-}]$ présentent des variations importantes, en relation

TABLEAU II

Données obtenues sur 4 groupes de *Carcinus maenas* adaptés à des eaux de salinités variées. Valeurs moyennes $\pm$ t.s.m ($P = 0.05$).

Données	Unités	Salinité (‰ S)			
		36.0	30.2	20.3	11.7
Nombred'animaux		9	9	8	10
Protéinessanguines	g/l	52 $\pm$ 13	49 $\pm$ 16	44 $\pm$ 20	44 $\pm$ 17
pH du sang		7.75 $\pm$ 0.05	7.81 $\pm$ 0.02	7.95 $\pm$ 0.09	8.14 $\pm$ 0.11
PCO ₂ du sang	torr	2.5 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.4
[HCO ₃ ⁻] + [CO ₃ ⁻]	mEq/l	7.0 $\pm$ 1.4	10.6 $\pm$ 1.6	8.5 $\pm$ 1.1	12.8 $\pm$ 3.2
[Na ⁺]	mEq/kg eau	516 $\pm$ 4	487 $\pm$ 12	405 $\pm$ 12	302 $\pm$ 15
[K ⁺]	mEq/kg eau	11.2 $\pm$ 0.4	9.8 $\pm$ 0.6	9.9 $\pm$ 0.8	6.1 $\pm$ 0.6
[Ca ⁺⁺]	mEq/kg eau	27.0 $\pm$ 1.6	22.9 $\pm$ 1.3	19.3 $\pm$ 1.8	13.7 $\pm$ 1.5
[Mg ⁺⁺]	mEq/kg eau	45.8 $\pm$ 2.4	34.9 $\pm$ 1.1	20.5 $\pm$ 1.7	16.1 $\pm$ 1.1

à la fois avec celles de PCO₂ et celles de pH. A l'exception d'une élévation transitoire de [HCO₃⁻] + [CO₃⁻] vers une salinité de 30‰ S, due en majeure partie à la variation correspondante de PCO₂, le phénomène essentiel est une augmentation continue des concentrations de bicarbonate et carbonate, à PCO₂ sensiblement constant, en même temps que la salinité s'abaisse. La variation de pH constatée est donc, pour une grande part, indépendante des phénomènes proprement respiratoires elle est due à une variation de l'excès de base (HARVEY, 1963) présent dans le sang. Bien que celle-ci puisse avoir des causes diverses, il est possible qu'elle dépende des modifications des échanges ioniques intervenant lorsque la salinité est abaissée.

4. VARIATIONS DE P₅₀ DANS LE SANG EN RAPPORT AVEC LA SALINITÉ DE L'EAU DANS LAQUELLE VIT L'ANIMAL

Dans 4 des 6 séries expérimentales ayant servi à établir les résultats précédemment décrits, un pool de sérum a été obtenu pour chaque série en mélangeant entre elles des fractions de 2 ml provenant de chaque crabe. Les variations de P₅₀ avec pH ont été établies pour chacun de ces 4 pools à la température de 15° C (Fig. 4). Quel que soit pH entre 7.4 et 8.2, P₅₀ diminue avec la salinité de l'eau à laquelle les crabes sont adaptés. On note également dans les mêmes conditions, une tendance à la diminution de l'effet Bohr défini par la pente $\Delta \log P_{50} / \Delta pH$ de chacune des courbes. L'analyse des concentrations de sodium, potassium, calcium et magnésium a été faite sur chacun des sangs recueillis (Tableau II). Leurs valeurs moyennes s'abaissent toutes

de façon significative avec la diminution de salinité. L'augmentation de P_{50} correspondante peut être attribuée, en partie du moins, à la diminution des concentrations de Ca et Mg, cations déjà connus pour leur action sur l'affinité pour l'oxygène de l'hémocyanine (PICKETT, RIGGS & LARIMER, 1966; SPOEK, 1967).

En reportant sur le diagramme $\log P_{50}$ versus pH (Fig. 4) les valeurs moyennes de pH indiquées au paragraphe précédent, il est possible de

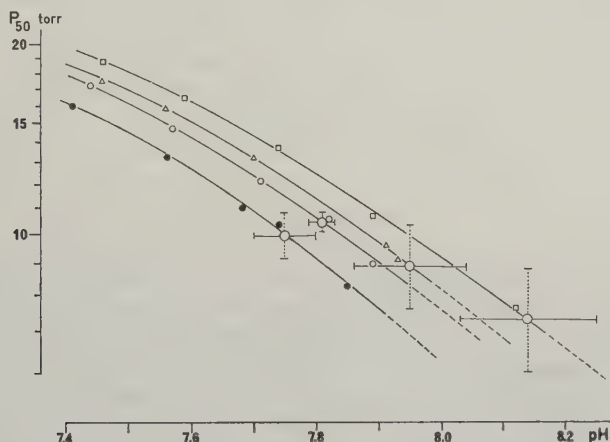


Fig.4. Variations de P_{50} avec pH pour 4 pools de sérum provenant de 4 séries de crabs adaptés à des eaux de mer de diverses salinités: 36‰S (●), 30.2‰S (○), 20.2‰S (△), 11.7‰S (□). Les valeurs moyennes de pH du sang prébranchial obtenues sur les mêmes crabs ont été reportées sur ce graphique. Température 15° C.

définir P_{50} moyen *in vivo* dans le sang prébranchial pour chaque série de crabs adaptés à des eaux de salinités différentes. L'intervalle de variation correspondant (Fig. 4) n'est défini que par la fluctuation de pH , la variabilité individuelle des courbes $\log P_{50}$ versus pH étant inconnue. On peut reconnaître qu'*in vivo*, le déplacement de pH provoqué par l'abaissement de salinité est tel que P_{50} diminue dans le sang prébranchial, passant de 10 torr pour $S = 36\%$ à 7 torr environ pour $S = 12\%$. Si pH était maintenu à sa valeur 7.74 correspondant à une salinité normale, P_{50} augmenterait aux faibles salinités et serait de 14 torr à $S = 12\%$.

IV. DISCUSSION

Les résultats qui viennent d'être exposés montrent essentiellement que, dans des conditions impliquant une variation de la demande métabolique d'oxygène, P_{50} est l'objet d'ajustements de type homéostatique

dont l'effet est de maintenir ses variations dans une marge assez strictement limitée (entre 7 et 12 torr). En effet, les deux types de conditions envisagées, élévation de la température ambiante et abaissement de la salinité, tendent à provoquer une augmentation de P_{50} , par simple effet thermodynamique dans le premier cas, par l'effet de la dilution des ions du milieu intérieur sur l'hémocyanine dans le second cas. Mais, cette diminution prévisible de l'affinité du pigment pour l'oxygène est en fait largement compensée *in vivo* par d'autres ajustements. Les mécanismes de ces ajustements sont variés, impliquant, soit une modification pour l'instant non élucidée de l'état physicochimique du sang en cas d'élévation de la température ambiante, soit une régulation du pH sanguin en cas d'abaissement de la salinité.

Quoiqu'il en soit, il importe de comprendre les raisons pour lesquelles l'approvisionnement normal en oxygène de l'animal semble nécessiter le maintien de P_{50} à une valeur relativement basse (< 12 torr). D'après les recherches classiques sur le transport de l'oxygène par le sang des crustacés décapodes (REDMOND, 1955, 1962, 1968; СПОЕК, 1962), la pression partielle d'oxygène PaO_2 du sang artériel est faible (5 à 24 torr) et ce sang n'est jamais entièrement saturé (49 à 85%). Il en résulte un large gradient de diffusion de l'oxygène au niveau de la barrière branchiale. Le rôle de l'hémocyanine serait alors non seulement d'assurer le transport de l'oxygène, mais également de permettre, grâce à sa grande affinité pour l'oxygène, le maintien de faibles PaO_2 et d'un gradient de diffusion important. Malgré la faible perméabilité de la cuticule branchiale, un approvisionnement suffisant en oxygène serait alors assuré. La grande affinité pour l'oxygène de l'hémocyanine aurait alors une valeur adaptative. Nos résultats sont cohérents avec cette idée. En effet, on conçoit bien que P_{50} soit soumis à des ajustements compensateurs dans les cas où l'état physicochimique du sang pourrait le faire augmenter. Le travail récent de JOHANSEN, LENFANT & MECKLENBURG (1970) ne change pas fondamentalement de ce point de vue la conception classique. Grâce à des méthodes plus raffinées, ces auteurs montrent que chez *Cancer magister* au repos, à 10° C, le sang artériel est pratiquement saturé en oxygène et que PaO_2 est élevé (91 torr). Le gradient moyen de diffusion de l'oxygène ΔPCO_2 (RANDALL, HOLETON & STEVENS, 1967) est beaucoup plus faible que celui calculé d'après les valeurs de REDMOND (1955) (120 torr), mais reste néanmoins élevé (60 torr), ce qui semble être caractéristique de beaucoup d'animaux aquatiques (RAHN, 1966). Dans les cas où la demande d'oxygène est importante, la capacité de transport du sang ne peut être augmentée que par l'accroissement, d'une part du débit cardiaque, d'autre part de la différence $CaO_2 - CvO_2$ des teneurs en oxygène des sangs artériel et veineux. Les mesures de JOHANSEN *et al.* (1970)

faites sur des crabes actifs montrent effectivement que $\text{CaO}_2\text{—CvO}_2$ augmente dans ces conditions, mais que la saturation complète du sang artériel n'est plus réalisée; ce dernier fait peut être attribué, entre autres causes, à des limitations des phénomènes de diffusion. Si l'on suppose que la tendance est la même en cas d'élévation de la température ou d'abaissement de la salinité, il devient évident que le maintien d'une affinité élevée pour l'oxygène est primordial pour permettre la saturation aussi complète que possible du pigment dans le sang artériel et assurer ainsi son efficacité maximum au système de transport de l'oxygène. Dans cet ordre d'idée, les ajustements de P_{50} mis en évidence par ce travail peuvent être considérés comme ayant une valeur adaptative dans le cas d'une espèce aussi eurytherme et euryhaline que *Carcinus maenas*.

V. RESUMÉ

L'élévation de la température et l'abaissement de la salinité de l'eau dans laquelle vit le crabe ont tendance à diminuer l'affinité pour l'oxygène du pigment respiratoire de *Carcinus maenas*. Quand la température s'élève, P_{50} est augmenté par simple effet thermodynamique et par le contrôle du $p\text{H}$ sanguin à des valeurs plus basses. Quand la salinité s'abaisse, la dilution du sang provoque également une augmentation de P_{50} .

In vivo, cependant, des ajustements compensateurs assurent le maintien de P_{50} dans des limites étroites (entre 7 et 12 torr). Ils consistent en une augmentation du $p\text{H}$ sanguin lorsque la salinité est diminuée, et en un abaissement de P_{50} , indépendamment de $p\text{H}$, à des températures supérieures à 21° C; ce dernier phénomène est peut-être en relation avec des modifications de la composition ionique du sang.

La valeur adaptative de ces faits est discutée en rapport avec les connaissances couramment admises concernant le transport de l'oxygène par le sang des crustacés décapodes.

ENGLISH SUMMARY

Rise of temperature and decrease of salinity of the water in which the crab lives, tend to diminish the O_2 -affinity of the blood respiratory pigment. When temperature rises, P_{50} increases by simple thermodynamical effect and by control of blood $p\text{H}$ at lower values. When salinity falls, blood dilution also causes the augmentation of P_{50} .

In vivo compensations, however, occur which maintain P_{50} within narrow limits (between 7 and 12 torr). These compensations are related to the rise of blood $p\text{H}$ accompanying the decrease of salinity and to the

fact that P_{50} shows a significant decrease at temperatures above 21° C which may be due to ion exchange between the internal and ambient media.

The adaptative value of these observations is discussed in relation to current knowledge concerning the O₂-transport function of blood of decapod crustaceans.

VI. RÉFÉRENCES

- BADINAND, A. & B. WINICKI, 1957. Dosage direct du calcium et du magnésium dans les milieux biologiques.—Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon **1**: 45–54.
- DAHL, E., 1956. Ecological salinity boundaries in poikilohaline waters.—Oikos **7**: 1–23.
- DRACH, P., 1939. Mue et cycle d'intermue chez les crustacés décapodes.—Annls Inst. océanogr., Monaco **19**: 103–391.
- DREUX, C., 1958. Dosage complexométrique du calcium et du magnésium sur une même prise d'essai.—Annls Biol. clin. **12**: 653–657.
- EVANS, P. D., 1972. The free-aminoacid pool of the hemocytes of *Carcinus maenas*.—J. exp. Biol. **56**: 501–507.
- GRIGG, G. C., 1969. Temperature-induced changes in the oxygen equilibrium curve of the blood of the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus*.—Comp. Biochem. Physiol. **28**: 1203–1223.
- HARVEY, H. W., 1963. The chemistry and fertility of sea waters. Cambridge University Press: 1–240.
- HOWELL, B. J., F. W. BAUMGARDNER, K. BONDI & H. RAHN, 1970. Acid-base balance in cold-blooded vertebrates as a function of body temperature.—Am. J. Physiol. **218**: 600–606.
- JOHANSEN, K., C. LENFANT & T. A. MECKLENBURG, 1970. Respiration in the crab *Cancer magister*.—Z. vergl. Physiol. **70**: 1–19.
- KIRBERGER, C., 1953. Temperaturadaptation der Sauerstoffbindung des Blutes von *Rana esculenta* L.—Z. vergl. Physiol. **35**: 153–158.
- LEVIN, R. & R. W. BRAUER, 1951. The biuret reaction for the determination of protein. An improved reagent and its application.—J. Lab. clin. Med. **38**: 474–480.
- PICKETT, S. M., A. F. RIGGS & J. L. LARIMER, 1966. Lobster hemocyanin: properties of the minimum functional subunit and of aggregates.—Science **151**: 1005–1007.
- RAHN, H., 1966. Aquatic gas exchange theory.—Resp. Physiol. **1**: 1–12.
- RANDALL, D. J., HOLETON, G. F. & E. D. STEVENS, 1967. The exchange of oxygen and carbon dioxide across the gills of rainbow trout.—J. exp. Biol. **46**: 339–348.
- REDMOND, J. R., 1955. The respiratory function of hemocyanin in Crustacea.—J. cell. comp. Physiol. **46**: 209–247.
- , 1962. Oxygen-hemocyanin relationship in the land crab, *Cardisoma guanhumi*.—Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole **122**: 252–262.
- , 1968. Transport of oxygen by the blood of the land crab, *Gecarcinus lateralis*.—Am. Zoologist **8**: 471–479.
- SCHWABE, E., 1933. Über die osmoregulation verschiedener Krebse (Malacostracaen).—Z. vergl. Physiol. **19**: 183–236.
- SPOEK, G. L., 1962. Verslag van onderzoekingen gedaan in het "Stazione Zoologica" te Napels.—Versl. gewone Verg. Afd. Natuurk. K. ned. Akad. Wet. **71**: 29–35.
- , 1967. The influence of salts on the binding of oxygen by the hemocyanin of the lobster *Homarus gammarus* L.—Acta physiol. pharmac. néerl. **14**: 506–507.

- STRAUB, M., 1957. Weitere Untersuchungen zur Temperaturadaptation der Sauerstoffbindung des Blutes von *Rana esculenta* L.—Z. vergl. Physiol **39**: 507–523.
- TRUCHOT, J. P., 1971a. Fixation de l'oxygène par le sérum de *Carcinus maenas* (L.) (crustacé décapode brachyoure).—C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris **272**: 984–987.
- , 1971b. Étude comparée de la fixation de l'oxygène par le sérum de cinq espèces de crustacés décapodes brachyours.—C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris **272**: 2706–2709.
- , 1973. Temperature and acid-base regulation in the shore crab *Carcinus maenas* (L.).—Resp. Physiol. **17**: 11–20.
- WALLACE, J. C., 1972. Activity and metabolic rate in the shore crab, *Carcinus maenas* (L.).—Comp. Biochem. Physiol. **41A**: 523–533.
- WEBB, D. A., 1939. The sodium and potassium content of sea water.—J. exp. Biol. **16**: 178–183.
- WOLVEKAMP, H. P., 1961. The evolution of oxygen transport. In: R. G. MACFARLANE & A. H. T. ROBB-SMITH. Functions of the blood. Academic Press, New York and London: 1–72.
- WOLVEKAMP, H. P. & T. H. WATERMAN, 1960. Respiration. In: T. H. WATERMAN. The Physiology of Crustacea. I. Academic Press, New York and London: 35–100.
- ZUCKERKANDL, E., 1957. La teneur en oxygène de l'hémolymph artérielle de *Maia squinado* aux divers stades d'intermue.—C.r. Séanc. Soc. Biol. **151**: 524–528.

TEMPERATURE AND ACID-BASE REGULATION IN THE SHORE CRAB *Carcinus maenas* (L.)

J. P. TRUCHOT¹

Laboratoire de Zoologie, Université de Paris VI, 9 quai Saint-Bernard, 75005 Paris,
and Laboratoire de Physiologie Respiratoire, C.N.R.S., 23 rue Becquerel, 67 Strasbourg 3, France

Abstract. The pH of *in vitro* anaerobically maintained blood of the crab *Carcinus maenas* varies with temperature, the mean relation being $\Delta\text{pH}/\Delta t = -0.0195$ pH unit $^{\circ}\text{C}^{-1}$ between 10 and 30 $^{\circ}\text{C}$. *In vivo* prebranchial blood shows a nearly parallel variation: $\text{pH} = 7.962 - 0.0162 t$, where t , the temperature of the sea water in which the crab lives, varies between 5 and 26 $^{\circ}\text{C}$. These values correspond to a nearly constant alkalinity of the blood, $[\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$ being of the order of 12.5. Mean P_{CO_2} is 1.7 torr at 5 $^{\circ}\text{C}$, and 4.1 torr at 26 $^{\circ}\text{C}$; $[\text{HCO}_3^-]$ and C_{CO_2} fall as temperature rises.

pH of the crab's blood thus appears to be controlled not only by a ventilatory mechanism acting on blood P_{CO_2} , but also by an adjustment of the ionic balance which modifies the blood concentration of bicarbonates.

Acid-base status	<i>Carcinus maenas</i>
Aquatic respiration	Control of breathing
Blood	Invertebrates

Vertebrate poikilotherms do not maintain a steady arterial pH in the face of varying body temperature. They possess a regulatory system such that as temperature rises, arterial pH falls in the ratio of 0.015 to 0.020 pH units per $^{\circ}\text{C}$ (Austin, Sunderman and Camack, 1927; Howell *et al.*, 1970; Rahn and Baumgardner, 1972; Reeves, 1972). This regulation is thought to be related to certain fundamental characteristics of their cellular and systemic physiology. Thus, whatever the temperature, $[\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$, the relative alkalinity of the blood with respect to neutrality of pure water, is maintained approximately constant (Howell *et al.*, 1970), as is also the net charge on proteins (Austin *et al.*, 1927; Reeves, 1972), on which depends the colloidal osmotic pressure of the interior milieu and the integrity of macromolecular protein structures.

This fall of blood pH with rising temperature is accompanied by an increase of Pa_{CO_2} and a decrease in $[\text{HCO}_3^-]$, whereas Ca_{CO_2} remains constant, at least in the frog (Reeves, 1972). Changes with temperature in the open system constituted by the animal's blood *in vivo* parallel those of the same blood in a closed system *in vitro* (Rosenthal, 1948).

Accepted for publication 22 August 1972.

¹ Reprint request: J. P. Truchot, Laboratoire de Zoologie, 9 quai Saint-Bernard, 75005 Paris, France.

Do the invertebrates possess a temperature-modified system for control of blood pH similar to that known for various poikilothermic vertebrates respiring air or water? This group of animals seems not to have been systematically studied, as we have found only values reported by Spoek, Bakker and Wolvekamp (1964) for pH of arterial blood of the snail *Helix pomatia* obtained by heart puncture varying between 7.73 at 30 °C and 7.99 at 5 °C. The present report concerns the crab *Carcinus maenas*, a crustacean living in the intertidal zone of temperate seas. At low tide, this animal emerges or is isolated in small tidal pools, and is thus subject to important changes of temperature in its natural environment.

Materials and methods

IN VIVO EXPERIMENTS

Adult male crabs at stage C₄ of molting (Drach, 1939) collected at Roscoff, Nord Finistère, France, were maintained for several days before experiments in a closed-system sea water aquarium (temperature 12–15 °C, chlorinity 19–20‰). Experimental groups of 6 to 9 crabs were acclimatized to temperatures between 5 and 26 °C ± 0.5 °C in aerated tanks of natural sea water (chlorinity 19–20‰). P_{CO₂} of this water remained less than 0.5 torr. The water, deep enough for the crabs to be permanently immersed, was changed every 48 hr. In preliminary experiments, crabs were placed for 4 days, then 6 days in water at 8 or 15 °C; 4 days was found to be sufficiently long for adaptation to a particular temperature.

Blood samples

Measurement of blood pH is extremely dependent on the method of blood collection (Rahn and Baumgardner, 1972). Since implanted catheters are soon obstructed by blood clots, blood samples were taken as quickly as possible from a freshly emerged crab held in the hand, not from the heart, which is difficult to puncture directly, but from infrabranchial sinuses at the base of the third and fourth pairs of walking legs accessible through a thin articular membrane. Blood was collected either in Radiometer glass capillaries or via hypodermic needles into plastic syringes, two techniques giving equivalent results. Sampling time for each method was about 30 sec. One sample was taken from each animal. For the few minutes between sampling and the end of pH measurements, the blood was kept at 0 °C. pH of freshly collected blood kept anaerobically varies little; at 0 °C, by less than 0.001 pH unit · min⁻¹. pH varies to the same extent in blood exposed without mixing to air, probably because there is no carbonic anhydrase in decapod crustacean blood (Wolvekamp and Kruyt, 1948). Nevertheless, contact with air was avoided during these manipulations.

Was the blood collected representative of that of the normal freely moving immersed crab? To test the accuracy of the method, we withdrew blood from 6 crabs at different instants following emersion. In fig. 1, pH of the freshly-drawn sample plotted against time of collection following emersion gives similar curves for 2 crabs. pH was nearly steady for 1–2 min, then dropped rapidly 1 to 3 min after emersion. Values

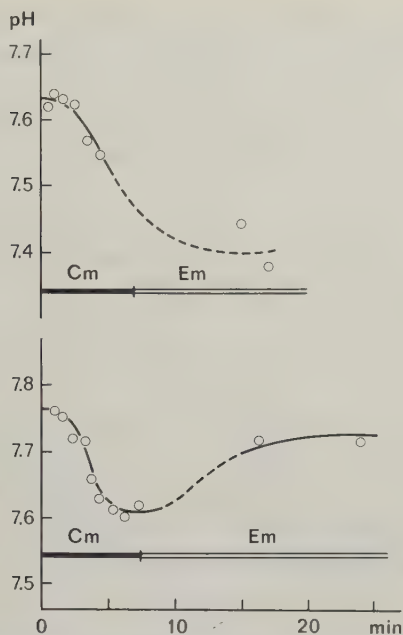


Fig. 1. pH variations of prebranchial blood as a function of time since emergence from water. Each point corresponds to a measurement made on a sample collected at time t . Cm: crab held in the hand. Em: free emerged crab.

obtained during the first phase may be considered normal. Immediate sampling upon emersion is thus essential for obtaining blood as nearly normal as possible.

Note that prebranchial blood was collected. It has been shown that pH of this blood is close to that of postbranchial blood; for a given animal, the difference is always less than 0.03 pH units.

Measurements

pH was measured on each blood sample with a Radiometer microelectrode equilibrated at the adaptation temperature of the animal and standardized against Radiometer precision buffers. The value recorded was the mean of two successive measurements agreeing within 0.01 pH unit. The remaining blood, about 0.5 ml, was kept at 0 °C for estimation of P_{CO_2} by the method of Astrup (1956).

The serum was decanted after spontaneous agglutination of the cells, and two aliquots were equilibrated in a microtonometer against two gas mixtures of air plus CO_2 , P_{CO_2} = 1 to 7 torr depending on the temperature. The pH values of the two aliquots transferred to a log P_{CO_2} -pH diagram permitted an estimate of P_{CO_2} by linear interpolation corresponding to the pH value of the original sample. Taking into account the experimental errors in pH measurements (± 0.005 unit), and the assimilation of the curved log P_{CO_2} -pH relation to a straight line in the interval considered, we estimate the precision of the P_{CO_2} measurements as ± 0.1 torr.

For each crab, the protein concentration of cell-free blood was determined by a biuret method (Levin and Brauer, 1951), with a bovine serum albumin preparation as standard.

Measurements on serum were taken as representative of whole blood, since the cell volume is not greater than 1 % of whole blood (Evans, 1972).

Calculations

Concentrations of bicarbonate, carbonate and total CO_2 of each sample were calculated from the Henderson-Hasselbalch equation in the form

$$\text{pH} + \text{pK}'_1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{\alpha_{\text{CO}_2} \cdot P_{\text{CO}_2}} = \text{pK}'_2 + \log \frac{[\text{CO}_3^{=}]}{[\text{HCO}_3^-]}.$$

We have disregarded the fraction of CO_2 directly combined with proteins as carbamates (Wolvekamp and Kruyt, 1948). α_{CO_2} has been taken as 90 % of that of sea water at the same temperature, as was found for oxygen (Truchot, 1971). All values used in calculations appear in table 1.

TABLE 1

Values of constants in calculations using the Henderson-Hasselbalch equation

Temperature °C	α_{CO_2} (1) $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{torr}^{-1}$	pK'_1 (2)	pK'_2 (3)
5	0.0660	6.071	9.418
10	0.0555	6.040	9.368
15	0.0470	6.010	9.320
16	0.0455	6.004	9.311
20	0.0400	5.981	9.273
21	0.0385	5.975	9.264
25	0.0345	5.953	9.228
26	0.0335	5.947	9.219
30	0.0310	5.926	9.185

(1) α_{CO_2} = 90 % of the solubility coefficient of CO_2 in sea water of chlorinity 19.5 % (cf. Harvey, 1963).

(2) pK'_1 = 6.01 at 15 °C (unpublished). Values at other temperatures calculated from Van 't Hoff equation with $\Delta H^\circ = 2240 \text{ cal} \cdot \text{mole}^{-1}$ (Edsall and Wyman, 1958).

(3) pK'_2 = 9.32 at 15 °C (unpublished). Values at other temperatures calculated from Van 't Hoff equation with $\Delta H^\circ = 3603 \text{ cal} \cdot \text{mole}^{-1}$ (Edsall and Wyman, 1958).

IN VITRO EXPERIMENTS

In vitro variations of pH with temperature in the serum of *Carcinus maenas* were studied on 8 animals obtained as above and kept in the same aquarium for 8 days. The blood, obtained by hypodermic puncture from the infrabranchial sinuses, was filtered through gauze to separate off the cells. The approximately 3 ml serum samples were equilibrated at 30 °C against a gas phase where $P_{\text{O}_2} = 150 \text{ torr}$ and $P_{\text{CO}_2} = 5.1$

torr. This P_{CO_2} , corresponding to the mean value in prebranchial blood of an animal living at 30°C was obtained by extrapolation from the *in vivo* experimental values. Equilibration took place in 10 ml glass syringes turning $20\text{ t}\cdot\text{min}^{-1}$ in a constant temperature bath for about 1 hr; the gas mixture was renewed several times during this period. The serum was then transferred to 3 ml glass syringes and the gas phase expelled. pH of the serum was measured in the syringes at 30, 25, 20, 15 and 10°C . In the intervals necessary for temperature adjustment of the pH electrode, the syringes were kept at 0°C . Serum contact with ambient air was rigorously avoided.

Results

IN VITRO VARIATIONS OF pH WITH TEMPERATURE

Figure 2 shows the serum pH variations with temperature for two animals; means of findings on all animals are given in table 2. pH is much higher in cooled serum in a closed anaerobic system where C_{CO_2} is constant. The mean slope of the 8 regression lines calculated from experimental points is $-0.0195 \pm 0.0002\text{ pH unit}\cdot^\circ\text{C}^{-1}$ between 10 and 30°C , and is independent of serum concentrations of protein and bicarbonate.

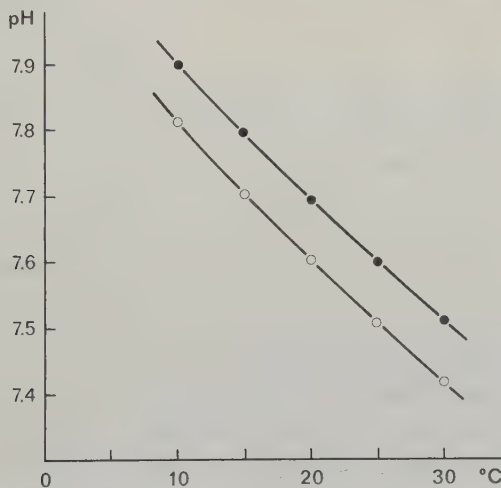


Fig. 2. Temperature-induced pH variations of *in vitro*, anaerobically maintained blood of 2 crabs. Initial conditions: $t = 30^\circ\text{C}$, $P_{\text{CO}_2} = 5.1\text{ torr}$. $\Delta\text{pH}/\Delta t = -0.019\text{ pH unit}/^\circ\text{C}$.

Even though these concentrations differed greatly among the 8 animals (proteins, $34\text{--}52\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $[\text{HCO}_3^-]$, $4.1\text{--}6.1\text{ mM}\cdot\text{L}^{-1}$ at 30°C), the extreme values of $\Delta\text{pH}/\Delta t$ were -0.0191 and -0.0198 . Variations of $[\text{HCO}_3^-]$ and $[\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}]$ were slight and correspond to those of dissolved CO_2 which were low due to the small change of P_{CO_2} .

IN VIVO VARIATIONS OF pH WITH TEMPERATURE

The results are based on 8 experimental series including 62 different crabs. In 6 of

these series, blood P_{CO_2} was estimated, and $[\text{HCO}_3^-]$, $[\text{CO}_3^{=}]$ and C_{CO_2} calculated. The findings are presented in table 3 and fig. 3.

TABLE 2

In vitro experiments. pH as a function of temperature of *Carcinus maenas* blood maintained in anaerobic conditions. Initial conditions: $P_{\text{CO}_2} = 5.1$ torr at 30°C . Mean values $\pm t \times \text{S.E.}$ ($P = 0.05$)

Temperature $^\circ\text{C}$	Blood pH (measured)	Blood P_{CO_2} (calculated)	$[\text{HCO}_3^-]$ (calculated) $\text{meq} \cdot \text{L}^{-1}$	$[\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{=}]$ (calculated) $\text{meq} \cdot \text{L}^{-1}$	C_{CO_2} (calculated) $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$
30	7.414 ± 0.048	5.10	4.90 ± 0.51	5.07 ± 0.55	5.14 ± 0.52
25	7.505 ± 0.047	3.97 ± 0.04	4.91 ± 0.51	5.10 ± 0.55	5.14 ± 0.52
20	7.600 ± 0.048	2.94 ± 0.02	4.92 ± 0.51	5.13 ± 0.55	5.14 ± 0.52
15	7.697 ± 0.051	2.14 ± 0.02	4.92 ± 0.51	5.16 ± 0.56	5.14 ± 0.52
10	7.806 ± 0.048	1.51 ± 0.02	4.92 ± 0.50	5.20 ± 0.56	5.14 ± 0.52

8 animals. Blood protein concentration: $42 \pm 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

$\Delta\text{pH}/\Delta t = -0.0195 \pm 0.0002 \text{ pH unit} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$ (mean of slopes of regression lines calculated for each blood sample). Blood P_{CO_2} , $[\text{HCO}_3^-]$ and $[\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{=}]$ calculated assuming C_{CO_2} constant with changing temperature.

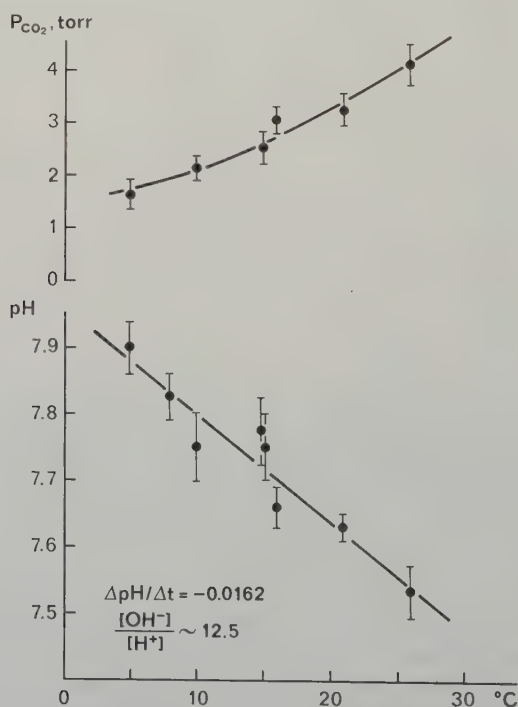


Fig. 3. Mean values $\pm t \times \text{S.E.}$ ($P = 0.05$) of pH and P_{CO_2} of prebranchial blood of *Carcinus maenas* specimens adapted to temperatures between 5 and 26°C . One measurement made on each of 6 to 9 crabs in each experimental series. Regression line calculated by the method of least squares.

TABLE 3

In vivo experiments. Mean values $\pm t \times \text{S.E.}$ ($P=0.05$) obtained on 8 groups of crabs acclimated to various temperatures. On 8 °C group and on one of the 15 °C groups, only pH was measured

Ambient temperature °C	Number of animals	Blood protein g · L ⁻¹	Blood pH	Blood P _{CO₂} torr	[HCO ₃ ⁻] meq · L ⁻¹	[HCO ₃ ⁻] + [CO ₃ ⁼] meq · L ⁻¹	C _{CO₂} mM · L ⁻¹
5	9	41 ± 13	7.90 ± 0.04	1.7 ± 0.3	7.3 ± 0.9	7.8 ± 1.0	7.7 ± 0.8
8	7	—	7.82 ± 0.03	—	—	—	—
10	8	37 ± 21	7.75 ± 0.05	2.1 ± 0.2	6.2 ± 1.0	6.5 ± 1.1	6.5 ± 1.1
15	6	—	7.77 ± 0.05	—	—	—	—
15	9	52 ± 13	7.75 ± 0.05	2.5 ± 0.3	6.6 ± 1.3	7.0 ± 1.4	6.9 ± 1.3
16	7	41 ± 14	7.66 ± 0.03	3.0 ± 0.2	6.3 ± 0.6	6.6 ± 0.6	6.6 ± 0.6
21	8	43 ± 10	7.63 ± 0.02	3.2 ± 0.3	5.7 ± 0.6	5.9 ± 0.6	5.9 ± 0.6
26	8	38 ± 12	7.53 ± 0.04	4.1 ± 0.4	5.3 ± 0.6	5.5 ± 0.7	5.5 ± 0.7

pH variations of prebranchial blood of *Carcinus maenas* with temperature may be described by the equation

$$\text{pH} = 7.962 - 0.0162 t \text{ } ^\circ\text{C}$$

$t \text{ } ^\circ\text{C}$ being the temperature, 5 to 26 °C, of the normal undiluted sea water in which the crab lived. This relation is almost parallel, on the one hand, to that found for *in vitro*, anaerobically maintained serum ($\Delta\text{pH}/\Delta t = -0.0195$), and, on the other, to that of the neutral point of pure water: $\text{pN} = \frac{1}{2} \text{pKw}$ ($\Delta\text{pN}/\Delta t = -0.0185$ in the temperature interval 5 to 26 °C). The ratio $[\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$ is held constant at approximately 12.5. In corollary, P_{CO_2} of prebranchial blood rises with temperature, from mean values of 1.7 torr at 5 °C to 4.1 torr at 26 °C. Such low values for P_{CO_2} are quite characteristic of animals breathing water (Rahn, 1966). The calculated concentrations for $[\text{HCO}_3^-]$ and $[\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{=}]$ decrease significantly with a rise in temperature (table 3). So does C_{CO_2} , which does not remain constant with a change in temperature. In this, the modification of the acid base balance of prebranchial blood with temperature changes *in vivo* differs from that of the same blood placed *in vitro* in anaerobic conditions and exposed to temperature variations.

Discussion

The blood of *Carcinus maenas* has, in *in vitro* anaerobic conditions, the characteristics of what may be called the Rosenthal system (Reeves, 1972). The coefficient of pH variation with temperature, $\Delta\text{pH}/\Delta t$, equals -0.0195 in the range 10 to 30 °C, close to that of neutrality of pure water, $\Delta\text{pN}/\Delta t = -0.0180$ for the same temperature interval. Consequently $[\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$ is approximately constant at any temperature. The Rosenthal system is considered to be a conjugation of the CO_2 -bicarbonate system, present in all biological liquids, and a weak acid-conjugate base system having a pK around 7 and a heat of dissociation, ΔH° , between 6 and 7 kcal · mole⁻¹

(Albery and Lloyd, 1967), values characteristic of imidazole groups of histidine in protein.

The major protein constituent of *Carcinus maenas* blood is the dissolved respiratory pigment hemocyanin (Busselen, 1970). Since hemocyanin contains about 9% histidine (Roche and Jean, 1934), the concentration of imidazole groups in *Carcinus* blood is around 20 to 30 mM · L⁻¹. Imidazole groups of hemocyanin are thus available to contribute to a Rosenthal system in *Carcinus maenas* blood.

$\Delta\text{pH}/\Delta t$ for *in vitro* blood of *Carcinus maenas* is much higher than the values reported for vertebrates: -0.0147 for human whole blood (Rosenthal, 1948), -0.0157 for frog whole blood (Reeves, 1972), -0.011 for human plasma (Rosenthal, 1948). That $\Delta\text{pH}/\Delta t$ should differ for systems made up of different proteins is not surprising, since the coefficient depends directly on the heat of dissociation, ΔH° , of the constituent acid groups. Now ΔH° varies not only with the chemical composition of the amino acid residues, but also with their position in the protein molecule (Edsall and Wyman, 1958). Imidazole groups of *Carcinus maenas* hemocyanin either must have a particularly high ΔH° , or their activity must be reinforced by that of other groups of high ΔH° which are active in the pH interval in question.

In vivo pH variations of prebranchial blood did not differ essentially from that of *in vitro* blood. A $\Delta\text{pH}/\Delta t = -0.0162$ for temperatures between 5 and 26 °C agrees well with values for several air-breathing vertebrate poikilotherms, -0.016 (Howell *et al.*, 1970), -0.017 (Tucker, 1966), and -0.018 (Wood and Moberly, 1970). This means that between 5 and 26 °C, pH is controlled so that $[\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$ is held approximately constant in the open system constituted by the blood of the living animal. *Carcinus maenas* is unusual in that the value of $[\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$ of about 12.5 is much less than that, 20 to 40, reported for vertebrates (Howell *et al.*, 1970). This value is for prebranchial blood of the crab, indeed, but because there is such a slight pH difference, less than 0.03 unit, between pre- and postbranchial blood of any one crab at a given temperature, the value must be valid for postbranchial blood as well. Probably, as Jackson (1971) emphasizes, blood pH is regulated such that $[\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$ is fixed at a particular value for any one species. Indeed, the range of pH's for invertebrate liquids given by Mangum and Shick (1972) implies a considerable inter-specific variability of $[\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$.

That a marine invertebrate should have a blood pH control mechanism similar to that of air-breathing vertebrates points up the importance of the phenomenon at so far poorly understood levels of cell metabolism. If, as we postulate below, the primary value regulated is $[\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$, or, what comes to the same thing, the degree of dissociation of imidazole groups on proteins (Reeves, 1972), then pH variations with temperature result from the physicochemical characteristics of the interior milieu alone.

Reeves (1972) has shown that the frog's CaCO_2 is constant when temperature varies. As a result, variations of dissolved and combined CO_2 compensate exactly for each other; then, when temperature rises, $[\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$ remains constant because of a rise of PaCO_2 which entails an increase in $[\text{dissolved CO}_2]$ and an equivalent decrease

in $[\text{HCO}_3^-]$. This rise of Pa_{CO_2} is due uniquely to a ventilatory mechanism: as Jackson (1971) has shown for the turtle *Pseudemys scripta elegans*, a rise in temperature provokes a decrease of $\dot{V}_E \text{ BTPS}/\text{M}_{\text{O}_2}$, the ventilatory flow rate-oxygen consumption ratio, and, consequently, an increase of PE_{CO_2} and Pa_{CO_2} .

The rise in blood P_{CO_2} with temperature observed in *Carcinus maenas* might suggest a similar ventilatory adjustment; in fact, calculated C_{CO_2} decreases considerably in this animal. The decrease of $[\text{HCO}_3^-]$ (table 3) is then not a consequence of a rise of P_{CO_2} alone. In other words, P_{CO_2} at the actual pH value should be higher at high temperatures than it is if the system tended to maintain C_{CO_2} independent of temperature. For example, if the mean value of $\text{C}_{\text{CO}_2} = 7.7 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$ at 5°C was to be the same at 26°C , pH values being those observed, P_{CO_2} would have to be 5.6 torr instead of the actual measured value of 4.1 torr.

Rahn (1966) and Rahn and Baumgardner (1972) have shown that for water-breathers the properties of physical milieu from which oxygen is extracted impose limits on the respiratory exchanges and on the characteristics of the blood in its role as a gas-transport system. In particular, PE_{CO_2} , and consequently Pa_{CO_2} and Pv_{CO_2} , cannot exceed certain values at a given temperature and for a given oxygen extraction coefficient. Limitations of this order must also apply to crabs living at a high temperature where metabolic oxygen demands are high. $[\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$ and pH could not then be regulated at appropriate levels by a ventilatory adjustment of Pa_{CO_2} alone, because Pa_{CO_2} could not rise high enough at such a temperature.

The findings suggest for *Carcinus maenas* an additional extraveritilatory mechanism, one inducing the decrease of blood bicarbonate concentration with increasing temperature and thus limiting the extent to which Pa_{CO_2} must rise in order that $[\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$ remain constant. This mechanism probably consists of an adjustment of the ionic balance. In Reeve's (1972) theoretical treatment of the Rosenthal system, the difference between concentrations of aprotic anions and cations, (Ca-Cc), is one parameter fixing pH at a particular value in the system. (Ca-Cc) is unvarying when C_{CO_2} is constant whatever the temperature. It is probable that in *Carcinus maenas*, an appropriate ionic regulation sets (Ca-Cc) at the particular temperature-dependent level which permits blood pH and thus $[\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$ to take their correct values.

Acknowledgements

Special thanks are due to the staff of the Station Biologique de Roscoff, Nord Finistère, France, for furnishing the animals.

Addendum

Since this paper was accepted for publication we had the opportunity to read an abstract by B. J. Howell, D. Goodfellow, H. Rahn and C. Herreid, entitled "Acid base balance in selected invertebrates as a function of body temperature", published in *The Physiologist* (1972) 15: 175. The authors reported a $\Delta \text{pH}/\Delta t$ value of 0.016 for *Carcinus* and similar values for *Limulus*, King Crab, *Uca* and *Gecarcinus*.

References

- Albery, W. J. and B. B. Lloyd (1967). Variation of chemical potential with temperature. In: Development of the Lung, edited by A. V. S. de Reuck and R. Porter. London, Churchill, pp. 30–33.
- Astrup, P. (1956). A simple electrometric technique for the determination of carbon dioxide tension in blood and plasma, total content of carbon dioxide in plasma, and bicarbonate content in "separated" plasma at a fixed carbon dioxide tension (40 mm Hg). *Scand. J. Clin. Invest.* 8: 33–43.
- Austin, J. H., F. W. Sunderman and J. G. Camack (1927). The electrolyte composition and the pH of serum of a poikilothermous animal at different temperatures. *J. Biol. Chem.* 72: 677–685.
- Busselen, P. (1970). The electrophoretic heterogeneity of *Carcinus maenas* hemocyanin. *Arch. Biochem. Biophys.* 137: 415–420.
- Drach, P. (1939). Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. Océanogr., Monaco N.S.* 19: 103–391.
- Edsall, J. T. and J. Wyman (1958). Biophysical Chemistry. Vol. 1. New York, Academic Press.
- Evans, P. D. (1972). The free-aminoacid pool of the hemocytes of *Carcinus maenas*. *J. Exp. Biol.* 56: 501–507.
- Harvey, H. W. (1963). The Chemistry and Fertility of Sea Waters. London, Cambridge University Press, 240 p.
- Howell, B. J., F. W. Baumgardner, K. Bondi and H. Rahn (1970). Acid-base balance in cold-blooded vertebrates as a function of body temperature. *Am. J. Physiol.* 218: 600–606.
- Jackson, D. C. (1971). The effect of temperature on ventilation in the turtle, *Pseudemys scripta elegans*. *Respir. Physiol.* 12: 131–140.
- Levin, R. and R. W. Brauer (1951). The biuret reaction for the determination of protein. An improved reagent and its application. *J. Lab. Clin. Med.* 38: 474–480.
- Mangum, C. P. and J. M. Shick (1972). The pH of body fluids of marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 42 A: 693–697.
- Rahn, H. (1966). Aquatic gas exchange: theory. *Respir. Physiol.* 1: 1–12.
- Rahn, H. and F. W. Baumgardner (1972). Temperature and acid-base regulation in fish. *Respir. Physiol.* 14: 171–182.
- Reeves, R. B. (1972). An imidazole alphastat hypothesis for vertebrate acid-base regulation: tissue carbon dioxide content and body temperature in bullfrogs. *Respir. Physiol.* 14: 219–236.
- Rosenthal, T. B. (1948). The effect of temperature on the pH of blood and plasma *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 173: 25–30.
- Roche, A. and G. Jean (1934). Recherches sur la composition en acides aminés des pigments respiratoires des Invertébrés (hémocyanines, hémérythrine, chlorocruorines, erythrocrurines). *Bull. Soc. Chim. Biol.* 16: 769–778.
- Spöck, G. L., H. Bakker and H. P. Wolvekamp (1964). Experiments on the hemocyanin-oxygen equilibrium of the blood of the edible snail (*Helix pomatia* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 12: 209–221.
- Truchot, J. P. (1971). Etude comparée de la fixation de l'oxygène par le sérum de cinq espèces de Crustacés Décapodes Brachyours. *C.R. Acad. Sc. Paris* 272: 2706–2709.
- Tucker, V. A. (1966). Oxygen transport by the circulatory system of the green iguana (*Iguana iguana*) at different body temperatures. *J. Exp. Biol.* 44: 77–92.
- Wolvekamp, H. P. and W. Kruyt (1948). Experiments on the carbon dioxide transport by the blood of the edible snail (*Helix pomatia*), the common crab (*Cancer pagurus*) and the common lobster (*Homarus vulgaris*). *Arch. Neerl. Physiol.* 28: 620–629.
- Wood, S. C. and W. R. Moberly (1970). The influence of temperature on the respiratory properties of Iguana blood. *Respir. Physiol.* 10: 20–29.

